вых значений, в сыворотках крови птицы опытной группы среднее значение должно быть не менее 1:800. Полученные данные представлены в таблице 2.

Данные таблицы 2 демонстрируют присутствие в крови птицы опытной группы антител к вирусу ИБК в защитных титрах, и, следовательно, высокую антигенную активность полученного препарата.

Выводы

На основании проведенных исследований можно сделать выводы:

1. Для инактивации штамма «Калужский» вируса ИБК возможно применение аминоэтилэтиленимина в заданной концентрации, температурном и временном режиме.

2. На основе полученного в данном режиме антигена возможно изготовление высокоиммуногенного вакцинного препарата для специфической профилактики ИБК.

РЕЗЮМЕ

Отрабатывали методику получения инактивированного вируса инфекционного бронхита кур (ИБК) штамм «Калужский». Работа включала в себя изучение воздействия на вирус химического инактиванта (аминоэтиэтиленимин) в заданной концентрации и температурном режиме, а также оценки антигенных свойств полученных в ходе опыта образцов инактивированной вакцины.

SUMMARY

Technique for the preparation of inactivated chicken infectious bronchitis virus, «Kaluzhsky» strain, was optimized. This included examination of the effect of chemical inactivant (aminoethyleneimine) on the virus at predetermined concentration and temperature as well as evaluation of antigenic properties of samples of inactivated vaccine prepared during the experiment.

Литература

1. Статистические методы в микробиологических исследованиях. / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев // Л.: Медгиз, 1962. – 180с.
2. Инфекционный бронхит кур (обзор литературы) / А. Н Куриленко, В. Л. Крупальник, Б. А. Якимчук // Ветеринария. - 1990. - №8. - С.36-43.
3. Вирусные болезни животных. / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина // М.: ВНИТИБТ 1998. – Гл. Инфекционный бронхит кур. - С.183-198.
4. T.R Doel Inactivation of viruses produced in animal// Animal Cell Biotechnology.-London, 1985.-V.2.-P.124-149.
5. S. Gard, E Luck. Inactivation of poliovirus by formaldehyde. Analysis of inactivation curves// Arch. ges. Virus. Forsch. –1957.–V.7.-P.471-493.

УДК: 619:616.98:578.831.31:616-074

В.Л. Гаврилова, Т.З. Байбиков

(Федеральное государственное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия)

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНА ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ С ПОМОЩЬЮ НЕПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Введение

Репродуктивно-респираторный синдром свиней причиняет значительный экономический ущерб свиноводству многих стран мира, поэтому, возникает необходимость своевременной постановки диагноза и проведения плановых мероприятий по профилактике и ликвидации очагов острых вспышек заболевания (3, 4, 5).

Диагностика РРСС основывается на анализе эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатах лабораторных исследований (1, 2, 4). Антиген вируса РРСС выявляют в зафиксированных в формалине срезах тканей органов при помощи НРИФ и других тестов, геном вируса - в ПЦР (7, 8).

НРИФ является экспресс методом в диагностике РРСС и обладает большой чувствительностью и специфичностью. Выявление вируса РРСС при помощи НРИФ в патологических материалах с использованием перевиваемой культуры клеток позволяет протестировать большое количество проб, значительно сократить срок получения результатов, а также заметно

снизить трудоемкость процесса и расход используемых компонентов реакции.

Целью нашей работы явилось изучение возможности выявления вируса РРСС в полевых образцах методом НРИФ в культуре клеток MARC-145.

Материалы и методы

В качестве патологического материала использовали пробы внутренних органов, полученные от экспериментально инфицированных вирусом РРСС подсвинков и в период с 1994 по 2006 гг. из хозяйств Российской Федерации различных регионов России: Белгородской, Владимирской, Вологодской, Воронежской, Ивановской, Калужской, Кемеровской, Кировской, Костромской, Курской, Нижегородской, Новгородской, Новосибирской, Омской, Оренбургской, Пензенской, Пермской, Рязанской, Саратовской, Свердловской, Смоленской, Тульской, Тюменской, Ульяновской и Челябинской областей, Краснодарского и Ставропольского краев.

При постановке НРИФ использовали коммерческие антивидовые конъюгаты, выпускаемые на предприятии по производству бакпрепаратов при НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, представляющие собой глобулиновую фракцию, выделенную из антисыворотки, полученной иммунизацией кроликов иммуноглобулинами свиньи, меченную ФИТЦ, а также антивидовой кроличий иммунофлюоресцирующий конъюгат против IgG свиней производства фирмы «SIGMA» (США).

В работе была использована перевиваемая культура клеток MARC-145 (клон культуры клеток почки макаки-резус МА-104), которую поддерживали путем регулярных пересевов с использованием питательной среды Игла с 10% сыворотки КРС.

Вначале отработали постановку реакции в монослое клеток MARC-145, выращенном в пенициллиновых флаконах. Постановка реакции включала следующие этапы:

- получение монослоя клеток MARC-145: засевали пенициллиновые флаконы клеточной суспензией с посевной концентрацией 150 тыс. кл/см^3 по 1 см^3 и инкубировали при +37°С в термостате в течение 48-72 часов;

- инфицирование монослоя клеток: на монослой наносили исследуемую суспензию в объеме 0.5 см^3 и выдерживали в течение 2 часов при температуре 37°С в термостате. Затем заливали в пенициллиновые флаконы поддерживающую питательную среду Игла в объеме 2 см^3 и инкубировали в течение 24-48 часов;

- получение препаратов из инфицированной вирусом и интактной культуры клеток. С этой целью вносили во флаконы по 0.2 см^3 смеси версена и трипсина и выдерживали в термостате в течение 10-15 минут до начала дезагрегации клеток. Затем клетки диспергировали пипетированием и раскапывали на предметные стекла (по 3-4 капли с концентрацией 10^6 кл/см^3) с помощью микродозатора;

- фиксация препаратов охлажденным при -20°С ацетоном, который дважды, с интервалом 5 минут, наносили на препараты, затем высушивали их на воздухе;

- взаимодействие антигена с антителами, для этого наслаивали на препараты гипериммунную к вирусу РРСС сыворотку крови свиней в разведении 1:80, выдерживали на контакте 30 минут, промывали водопроводной водой и высушивали препараты;

- взаимодействие комплексов антиген-антитело с антивидовым флюоресцирующим конъюгатом - кроличьими анти-свиными глобулинами, меченными флюоресцеина-5-изотиоцианатом. Данный конъюгат наслаивали на препараты в рабочем разведении (1:200), инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре, затем препараты промывали водопроводной водой и высушивали;

- контрастирование препаратов с помощью окрашивания их водным раствором Эванса голубого в разведении $1/10^6$ в течение 10 минут при комнатной температуре с последующим промыванием водопроводной водой и высушиванием;

- учет результатов реакции в люминесцентном микроскопе: при регистрации ярко зеленого внутриплазматического свечения клеток в положительном контроле и отсутствии такого свечения в отрицательном контроле переходили к просмотру препаратов с исследуемым материалом.

Затем, методику постановки НРИФ отработали с использованием монослоя клеток MARC-145, выращенного в лунках 96-луночных полистироловых микропланшетов: в лунки 96-луночных микропланшетов вносили по 50 мкл питательной ростовой среды Игла, затем – по 100 мкл клеточной суспензии MARC-145 с посевной концентрацией 200000 кл/см^3. Через 24-48 часов инкубирования в CO_2-инкубаторе с 5% CO_2 при 37°С выросший монослой клеток инфицировали испытуемыми 33%-ными суспензиями патологических материалов, которые вносили по 50 мкл в лунки (по 4

повторности). В качестве положительного контроля использовали суспензию, полученную из патматериала от экспериментально инфицированного интратрахеально вирусом РРСС, штамма Lelystad, подсвинка. В качестве отрицательного контроля использовали суспензию, полученную из кусочков внутренних органов от клинически здорового подсвинка. Плашки помещали в CO_2-инкубатор на 24-48 часов при температуре 37°С. Через 24-48 часов удаляли содержимое лунок, плашку высушивали на воздухе в течение ночи и проводили фиксацию в смеси, состоящей из равных частей дистиллированной воды, спирта и ацетона при комнатной температуре (смесь вносили по 50 мкл в каждую лунку и тотчас удаляли), затем, микропланшеты высушивали на воздухе. Потом, в каждую лунку вносили серопозитивную к вирусу РРСС сыворотку крови свиней в рабочем разведении и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем, плашки тщательно промывали под слабой струей водопроводной воды, ополаскивали дистиллированной водой и подсушивали на фильтровальной бумаге. После этого, в каждую лунку вносили по 50 мкл рабочего разведения антивидового флюоресцирующего конъюгата и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем, микропланшеты промывали и высушивали, как было указано выше. С целью повышения контрастности препаратов в каждую лунку вносили по 50 мкл водного раствора Эванса голубого в разведении $1/10^6$ и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. По истечении времени плашку промывали дистиллированной водой, затем тщательно высушивали и просматривали под люминесцентным микроскопом.

Результаты и обсуждения

При оценке результатов учитывали количество флюоресцирующих клеток и интенсивность свечения цитоплазмы.

На первых этапах работы использовали в качестве испытуемого материала пробы органов и тканей, полученные от экспериментально инфицированных вирусом РРСС, штамма Lelystad, и незараженных подсвинков. Опыты проводили на серонегативных к вирусу РРСС подсвинках с массой тела 20-25 кг. Животных заражали вирусом РРСС, штамма Lelystad, прошедшим 5 пассажей в перевиваемой культуре клеток MARC-145 с титром инфекционности 4.25 lg $ТЦД_{50}/см^3$ интратрахеально. На пике температурной реакции (отмечали повышение температуры тела до 40,5-40,9°С) животных убивали и отбирали пробы различных органов и тканей для исследования на наличие вируса в непрямой реакции иммунофлюоресценции. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, положительные результаты были получены в НРИФ только в тех препаратах, которые были приготовлены из проб органов инфицированных вирусом РРСС свиней. В неинфицированных клетках не наблюдали флюоресцирующего цитоплазматического свечения, что являлось отрицательным результатом.

Следовательно, данная методика позволяет специфично обнаруживать антиген вируса РРСС в исследуемом патологическом материале, полученном от больных РРСС животных, и может быть использована в специализированных ветеринарных лабораториях страны.

На втором этапе исследования разработанную методику по выявлению вируса РРСС при помощи НРИФ апробирова-

Таблица 1

Результаты обнаружения вируса РРСС в органах экспериментальных подсвинков (n=5)

№ п/п	Исследуемый материал	Результаты исследований в НРИФ органов поросят	
		инфицированных	не инфицированных
1	сгусток крови	+	-
2	сыворотка крови	+	-
3	легкие	+	-
4	макрофаги	+	-
5	миндалины	+	-
6	лимфатические узлы	+	-
7	селезенка	+	-

Таблица 2

Результаты исследования на наличие вируса РРСС в НРИФ полевых патологических материалов от свиней

Наименование проб патологических материалов	Количество исследованных проб		
	всего	положительных	%
Внутренние органы	236	142	33,51
Транссудат или экссудат	128	83	64,84
Кровь от домолозивных поросят	33	22	66,67
Кровь от свиноматок	259	185	71,42
Кровь от мертворожденных поросят	13	9	69,23
Кровь от поросят-сосунов	38	26	68,42
Кровь от хряков	7	3	42,85
Молозиво	3	2	66,67
Всего:	717	472	65,83

ли при тестировании проб патологических материалов, полученных из различных хозяйств РФ. Результаты данных исследований представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что в НРИФ на наличие вируса РРСС было исследовано 717 проб патологических материалов, из них выявлено положительных – 472 (65,82%). Результаты проведенных исследований свидетельствуют о широком распространении РРСС в свиноводческих хозяйствах России.

В дальнейшем, пробы патологического материала, в которых при помощи НРИФ был выявлен вирус РРСС, использовали для выделения и адаптации изолятов к перевиваемой культуре клеток MARC-145 с целью дальнейшего изучения и оценки их пригодности в качестве производственных штаммов.

Выводы

Результаты проведенных исследований показывают, что использование метода иммунофлюоресценции в культуре клеток MARC-145, выращенной в микропланшетах, позволяет специфично выявлять наличие вируса РРСС в пробах патологического материала, одновременно исследовать большое количество проб и экономно расходовать все компоненты реакции.

РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты выявления вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) в пробах суспензий патологических материалов, отобранных от экспериментально инфицированных свиней или полученных из различных свиноводческих хозяйств Российской Федерации, при помощи непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) с использованием монослоя перевиваемой культуры клеток MARC-145.

SUMMARY

Possibility of indication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in patological materials by indirect immunofluorescence method is shown. Indication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in microplates not only gains time, but also economize all components of essay.

Литература

1. Байбиков, Т.З. Репродуктивно-респираторный синдром свиней / Т.З. Байбиков // Вет. врач.-2000.-№2.-С.20-24.
2. Использование реакции непрямой иммунофлюоресценции для обнаружения антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) / В.В.Куриннов, И.Ф. Вишняков, Е.А. Балашова [и др.] // Актуал. вопр. вет. вирусол.: матер. науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней - неотложные проблемы науки и практики».-Покров, 1995.-С.151-152.
3. Кукушкин, С.А. Особенности течения и вакцинопрофилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней в Российской Федерации: дис. … канд. вет. наук / Кукушкин Сергей Анатольевич.-Владимир, 2000.-176с.
4. Кукушкин, С.А. Репродуктивно-респираторный синдром свиней (эпизоотология, диагностика, специфическая профилактика) / С.А. Кукушкин // Пром. и племенное свиноводство.-2006.-№3.-С.60-61.
5. Мищенко, В.А. Состояние и перспективы исследований по репродуктивно-респираторному синдрому свиней / В.А. Мищенко // Актуал. вопр. вет. вирусол.: матер. науч.-практ. конф. ВНИИВ-ВиМ «Классическая чума свиней - неотложные проблемы науки и практики».-Покров, 1995.-С .148-151.
6. Суханова, О.В. Разработка средств и методов лабораторной диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней: дис. … канд. вет. наук. / Суханова Ольга Валентиновна.-Покров, 1997.
8. A sensitive fluorescence in situ hybridization tech-

nique for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / L.L. Chueh, K.H. Lee, C.R. Jeng, V.F. Pang // J. Virol. Methods.-1999.-V.79, №2.-P.133-40.

А.П. Золототрубов, Д.В. Федосов
(ВНИВИПФиТ РАСХН, г. Воронеж, Ветеринарный диагностический центр, г. Воронеж)

РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД В ДИАГНОСТИКЕ РЕТРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ КОШЕК

Рентгенологическое исследование является объективным дополнительным методом, дающим точное изображение многих органов и тканей, и необходимой составляющей в диагностике ретровирусных инфекций кошек и сопутствующих болезней.

Обзорная рентгенография незаменима при диагностике медиастинальных неоплазий (лимфомы, лимфосаркомы) при синдроме дисфагии/регургитации. Кроме того, данный метод визуализации используется при диагностике хронического прогрессирующего эрозивного полиартрита и пролиферативного периостита, вызванных синцитиальным вирусом, для уточнения локализации и распространения неоплазий, а также выявления болезней ассоциированных с ретровирусными инфекциями.

Медиастинальная лимфома/лимфосаркома. Обычно проводится обзорная рентгенография грудной клетки. Целью визуализации является скиаграфический анализ основных рентгенографических проекций. При этом определяется положение и видимости трахеи, основных бронхов, аорты, краниальной и каудальной полой вен, силуэта сердца и т.д. В большинстве случаев обзорную рентгенографию проводят в 2-х проекциях: правой (или левой) боковой и дорсовентральной /ДВ/ (или вентродорсальной /ВД/), т.е. II (I) и IV (III) укладки соответственно. При лимфомах и лимфосаркомах происходит смещение трахеи дорсально, медиастинальные массы располагаются обычно в передней части грудной клетки и могут частично или полностью скрывать тень сердца. Наличие плеврального выпота – один из часто встречающихся признаков при новообразованиях средостения и легких (рис.1, 2).

При поражении средостения рентгенография грудной клетки выявляет повышенную плотность (в боковой) и расширение (в ДВ или ВД проекциях). У здоровых кошек прекардиальное средостение не должно быть видно, выходящим за контуры грудного отдела позвоночника (в ДВ или ВД проекциях). На снимках отмечается расширение и усиление затененности структур краниального средостения, как

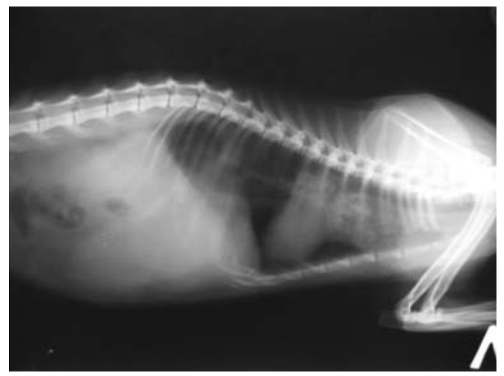




Рисунок 1, 2. Обзорная рентгенография грудной клетки в боковой и дорсовентральной проекциях. Новообразование средостения краниальной части грудной клетки и в области основания сердца, трахея смещена опухолевыми массами дорсально. Поражения правой сердечной и верхушечной долей легкого, характерные для плеврального выпота и ателектаза. Медиастинальная лимфома у ВЛК-положительного животного (беспородная кошка, 5 лет). Стадия 1. Детекция генома вируса (провирус) в ПЦР по участку gag-гена.